

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年8月18日(18.08.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/075615 A1

- (51) 国际分类号⁷: C11C 3/10, C07C 69/24, C10G 3/00, C12P 7/64
- (21) 国际申请号: PCT/CN2004/001372
- (22) 国际申请日: 2004年11月29日(29.11.2004)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200410000697.9 2004年1月16日(16.01.2004) CN
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园82号信箱, Beijing 100084 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 杜伟(DU, Wei) [CN/CN]; 刘德华(LIU, Dehua) [CN/CN]; 李俐林(LI, Lili) [CN/CN]; 徐圆圆(XU, Yuanyuan) [CN/CN]; 王利(WANG, Li) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园82号信箱, Beijing 100084 (CN)。
- (74) 代理人: 永新专利商标代理有限公司北京办事处(NTD PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD., BEIJING OFFICE); 中国北京市金融大街27号投资广场A座10层, Beijing 100032 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。
- 所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A NEW PROCESS FOR PRODUCING BIODIESEL FROM OILS AND FATS CATALYZED BY LIPASE IN ORGANIC MEDIUM REACTION SYSTEM

(54) 发明名称: 在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的新工艺

(57) Abstract: This invention provides a new process for producing biodiesel from oils and fats catalyzed by lipase in organic medium reaction system. In this process, a short chain alcohol ROH is acyl acceptor, some organic relatively hydrophilic solvents with no negative effect to the reactivity of the lipase act as reaction medium, the oils and fats catalyzed by lipase is a feedstock, transesterification happens and biodiesel is obtained. In the process of this invention, the oils and fats feedstock can be nearly substantially converted to biodiesel and the by-product glycerin, the yield of the biodiesel is up to 94%. These new type organic medium reaction systems may promote the solubility of the short chain alcohol such as methanol in the oils and fats, and may dissolve part of the by-product glycerin, consequently, they can remarkably enhance the lipase reactivity, shorten enzymatic reaction time and prolong the use life of the lipase.

(57) 摘要

本发明提供了一种在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的新工艺。该工艺是以短链醇 ROH 作为反应酰基受体, 用一些对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂作为反应介质, 利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油。在本发明的方法中, 油脂原料几乎可完全转化生成生物柴油和副产物甘油, 生物柴油得率达 94% 以上。这些新型有机介质反应体系可以促进甲醇等短链醇在油脂中的溶解, 并且可以部分溶解副产物甘油, 从而可显著提高酶反应活性、缩短酶促反应时间并延长酶的使用寿命。

在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的新工艺

技术领域

本发明属于生物油脂合成领域，特别涉及利用有机溶剂作为反应介质的一种在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的新工艺。

背景技术

油脂工业的新前景—生物柴油是由生物油脂原料通过转酯反应生成的长链脂肪酸酯类物质，是一种新型的无污染可再生能源。生物柴油的燃烧性能可以与传统的石油系柴油媲美，其燃烧后发动机排放出的尾气里有害物质比传统石化柴油降低了 50%。目前生物柴油的研究和应用已经受到了广泛的关注。

目前生物柴油主要是用化学法生产，即用动植物油脂和一些短链醇（例如甲醇或乙醇）在碱性或者酸性催化剂作用下进行转酯反应，生成相应的脂肪酸短链酯。化学法制备生物柴油存在如下一些不可避免的缺点：①油脂原料中的游离脂肪酸和水严重影响反应的进行；②低碳醇在油脂中溶解性不好，易导致乳化液的形成从而使得后续处理过程复杂；③工艺要求短链醇用量大大超过反应摩尔比，过量短链醇的蒸发回流增大过程能耗。

由于利用生物酶法合成生物柴油具有反应条件温和、无污染物排放、油脂原料中的游离脂肪酸和少量水不影响酶促反应等优点，符合绿色化学的发展方向，因而日益受到人们的重视。

但同化学方法相比，生物酶法也存在如下一些亟待解决的问题。在 Shimada Yuji 等人的题为 Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing (Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,

2002, 17:133-142) 的文献中报道: 甲醇、乙醇等短链醇在油脂原料中的溶解性较差, 不利于反应的进行; 其次, 过量醇的存在会导致脂肪酶严重失活, 故在利用生物酶法生产生物柴油的工艺过程中, 多采用分批加入短链醇的方式以缓解其对酶的毒害作用。这种方式操作繁琐, 反应时间较长; 另外, 以短链醇作为反应的酰基受体, 反应过程中有副产物甘油产生, 亲水性的甘油容易附着在固定化酶内孔及外表面, 从而对酶的活性位点形成“屏蔽”, 严重影响酶反应活性; 而且, 同化学方法相比, 酶法合成生物柴油的得率相对较低。为改善以上情况, 一些学者尝试采用有机溶剂反应体系合成生物柴油, 文献 [Shimada Yuji et al. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 17:133-142] 报道: 采用一些疏水性较强的有机溶剂如己烷、环己烷、石油醚等作为反应介质。这些疏水性有机溶剂可以很好地溶解油脂, 在一定程度上能促进反应的进行; 但由于这些疏水性较强的有机溶剂并不能有效溶解甲醇等低碳醇以及副产物甘油, 故对酶反应活性、酶的使用寿命以及生物柴油得率等并未有明显改善。

发明内容

本发明的目的在于提出一种在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的新工艺。该工艺是以短链醇 ROH 作为反应酰基受体, 用对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂作为反应介质, 利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油; 其特征在于: 将醇脂摩尔比为 3: 1~6: 1 的短链醇和油脂、基于油脂体积的 20-200% 的有机溶剂和基于油脂质量的 2-30% 的脂肪酶, 装入酶反应器中混合均匀, 加热至 20℃~60℃, 反应 5-24 小时, 将油脂原料转化生成生物柴油和副产物甘油。

具体实施方式

在本发明的新工艺中，所述相对亲水的有机溶剂优选为叔丁醇或短链脂肪酸酯 RCOOR' ，其中 R 和 R' 为具有 1—4 个碳原子的烷基。

所述脂肪酶为微生物脂肪酶，优选为 Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435 或它们的混合物。

所述油脂为生物油脂，优选为植物油脂、动物油脂、废食用油或炼油脚料。

所述植物油脂包括蓖麻油、菜籽油、大豆油、花生油、玉米油、棉子油、米糠油以及藻类油脂。

所述动物油脂为鱼油或猪油。

所述短链醇 ROH 中 R 为具有 1-5 个碳原子的烷基，该短链醇优选为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇。

所述短链醇与油脂的反应摩尔比优选为 3:1~5:1，优选的有机溶剂添加量为基于油脂体积的 50%-100%。

所述的酶反应器可以是具塞的三角瓶或其它各种合适的酶反应器。所述的加热步骤优选在可自动控温的往复摇床或适于酶催化反应的各种生化反应器中进行。优选的反应温度为 $30^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 。

本发明的有益效果是提高了酶反应活性、延长了酶的使用寿命并显著提高了生物柴油得率。这些新型有机介质反应体系可以促进甲醇等短链醇在油脂中的溶解，有效降低短链醇对酶反应活性的负面影响；其次，在这种有机介质反应体系中，可以一次性加入反应所需的短链醇，从而可显著缩短酶促反应时间、提高生物柴油得率，生物柴油得率达 94% 以上；另外，这些相对亲水的有机溶剂在一定程度上可以部分溶解甘油，可以有效降低反应物短链醇以及副产物甘油对酶反应活性的负面影响、显著提高酶反应活性，有效改善甘油对固定化酶孔径的“屏蔽”状况，提高酶反应活性并延长酶的使用寿命。

下面通过实施例来进一步说明本发明。

实施例 1

将摩尔比为 4: 1 的甲醇和菜籽油（菜籽油 9.65g）和基于油脂体积 100 %的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入基于油脂质量 10%的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 6 小时后生产出生物柴油 9.64g，生物柴油得率约为 100%。

实施例 2

将摩尔比为 3: 1 的甲醇和大豆油（大豆油 9.65g）和基于油脂体积 20%的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 20℃后，加入基于油脂质量 2%的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 24 小时后生产出生物柴油 9.17g，生物柴油得率为 95%。

实施例 3

将摩尔比为 5: 1 的乙醇和棉籽油（棉籽油 9.65g）、基于油脂体积 200%的甲酸甲酯，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 60℃后，加入基于油脂质量 10%的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 12 小时后生产出生物柴油 9.1g，生物柴油得率为 94%。

实施例 4

将摩尔比为 3: 1 的丁醇和废食用油（废食用油 9.65g）、基于油脂体积 80 %的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动

控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入基于油脂质量 10%的固定化脂肪酶 Novozym 435 开始反应，经 7 小时后生产出生物柴油 9.65g，生物柴油得率为 100%。

实施例 5

将摩尔比为 3: 1 的甲醇和大豆油（大豆油 9.65g）、基于油脂体积 50%的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入基于油脂质量 20%的固定化脂肪酶 Lipozyme TL 开始反应，经 10 小时后生产出生物柴油 9.1g，生物柴油得率为 94%。

实施例 6

将摩尔比为 4: 1 的戊醇和菜籽油（菜籽油 9.65g）、基于油脂体积 100 %的丁酸丁酯，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 50℃后，加入基于油脂质量 30%的固定化脂肪酶 Lipozyme TL 开始反应，经 8 小时后生产出生物柴油 9.17g，生物柴油得率为 95%。

实施例 7

将摩尔比为 3: 1 的乙醇和棉籽油（棉籽油 9.65g）、基于油脂体积 80%的叔丁醇，装入具塞三角瓶中混合均匀，并置于可自动控温的往复摇床中加热至 40℃后，加入基于油脂质量 20%的固定化脂肪酶 Lipozyme RM 开始反应，经 10 小时后生产出生物柴油 9.1g，生物柴油得率为 94%。

实施例 8:

将实施例 1 中反应后的脂肪酶直接滤出用于下一批次反应, 其他反应条件同实施例 1, 如此将脂肪酶连续回用 10 次。在第 10 个反应批次中, 反应 6 小时可生产出生物柴油 9.62g, 生物柴油得率仍高达 99%。

根据上述实施例, 以叔丁醇、短链脂肪酸酯 RCOOR' (R 、 R' 为具有 1-4 个碳原子数的烷基) 作为有机介质反应体系, 以短链醇 ROH (R 为具有 1-5 个碳原子数的烷基) 作为反应酰基受体时, 在适宜的温度范围下加入基于油脂质量 2%~30% 的固定化脂肪酶 Novozym 435 (来源于 *Candida antarctica*)、Lipozyme RM (来源于 *Rhizomucor miehei*) 或 Lipozyme TL (来源于 *Thermomyces lanuginosus*), 不同生物油脂原料(蓖麻油、菜籽油、棉籽油、废食用油、大豆油、鱼油、猪油、炼油下脚料、藻类油脂等)都能被高效转化生成生物柴油。

权利要求

1. 一种在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，该工艺是以短链醇 ROH 作为反应酰基受体，用对酶反应活性没有负面影响的相对亲水的有机溶剂作为反应介质，利用生物酶催化油脂原料进行转酯反应合成生物柴油；其特征在于，将醇脂摩尔比为 3: 1~6: 1 的短链醇和油脂、基于油脂体积的 20-200% 的有机溶剂和基于油脂质量的 2-30% 的脂肪酶，装入酶反应器中混合均匀，加热至 20℃~60℃，反应 5-24 小时，将油脂原料转化生成生物柴油和副产物甘油。

2. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述相对亲水的有机溶剂选自叔丁醇以及短链脂肪酸酯 RCOOR'，其中 R 和 R' 为具有 1-4 个碳原子的烷基。

3. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述脂肪酶为微生物脂肪酶。

4. 根据权利要求 3 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述的微生物脂肪酶包括 Lipozyme TL, Lipozyme RM, Novozym 435 以及它们的混合物。

5. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述油脂为生物油脂。

6. 根据权利要求 5 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述的生物油脂包括植物油脂、动物油脂、废食用油以及炼油脚料。

7. 根据权利要求 6 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺，其特征在于，所述植物油脂包括蓖麻油、菜籽油、大豆油、花生油、玉米油、棉子油、米糠油以及藻类油脂。

8. 根据权利要求 6 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述动物油脂为鱼油或猪油。

9. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述短链醇 ROH 中 R 为具有 1-5 个碳原子的烷基。

10. 根据权利要求 9 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述短链醇为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇。

11. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述短链醇与所述油脂的摩尔比为 3: 1~5: 1。

12. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述有机溶剂的添加量为基于油脂体积的 50%—100%。

13. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述的加热步骤在可自动控温的往复摇床中进行。

14. 根据权利要求 1 所述的在有机介质反应体系中以脂肪酶转化油脂生产生物柴油的工艺, 其特征在于, 所述的反应温度为 30℃~50℃。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C11C3/10,C07C69/24,C10G3/00,C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C11C,C07C,C10G,C12P,C10L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CPRS, WPI, EPODOC, PAJ, CA:biodiesel, fatty acid alkyl ester, lipase, transesterif+, solvent, methanol, ethanol, tert-butyl alcohol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP2002233393 A(NATIONAL RESEARCH INST OF BREWING) 20 Aug. 2002 (20.08.03) ,Table 2 in Page 4,Column 9 Line 10-12,Line 43-49,Column 11 line 27-Column 15 Line 8	1, 3, 5, 11, 14
A	TW491890 A(WU W T) 21.Jun. 2002 (21.06.02)	1-14
A	JP11263750A(OSAKA CITY ETAL)28.Sep. 1999 (28.09.99)	1-14
A	MODERN CHEMICAL ENGINEERING, VOL.23 NO.9, Published In Sep.2003, NIE Kaili, WANG Fang, TAN Tianwei "Biodiesel Production by Immobilized Lipase", P35-P38	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 17 Feb.2005	Date of mailing of the international search report 03 · MAR 2005 (03 · 03 · 2005)
Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, CHINA	Authorized officer WANG Suyan
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No. (86-10)62084834

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2004/001372

JP2002233393 A	20-08-2002	NONE	
TW491890 A	21-06-2002	FR2824075 A1	31-10-2002
		DE10217607 A1	31-10-2002
JP11263750A	28-09-1999	NONE	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/001372

A. 主题的分类

IPC⁷: C11C3/10,C07C69/24,C10G3/00,C12P7/64

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁷: C11C,C07C,C10G,C12P,C10L

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CPRS, WPI, EPODOC, PAJ, CA: biodiesel, fatty acid alkyl ester, lipase, transesterif+, solvent, methanol, ethanol, tert-butyl alcohol: 生物柴油, 脂肪酸甲酯, 酶, 溶剂, 叔丁醇

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2002233393 A(NATIONAL RESEARCH INST OF BREWING) 2002 年 08 月 20 日(20.08.03), 第 4 页表 2, 第 9 栏第 10-12 行, 43-49 行, 第 11 栏第 27 行-第 15 栏 8 行	1, 3, 5, 11, 14
A	TW491890 A(WU W T) 2002 年 06 月 21 日(21.06.02)	1-14
A	JP11263750A(OSAKA CITY 等) 1999 年 09 月 28 日(28.09.99)	1-14
A	现代化工, 第 23 卷第 9 期, 2003 年 9 月出版, 聂开立, 王芳, 谭天伟"固定酶法生产生物柴油"	1-14

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

17/02/2005

国际检索报告邮寄日期

03·3月2005 (03·03·2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

王素燕

电话号码: (86-10)62084834

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001372

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2002233393 A	20-08-2002	NONE	
TW491890 A	21-06-2002	FR2824075 A1	31-10-2002
		DE10217607 A1	31-10-2002
JP11263750A	28-09-1999	NONE	